

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-67673

(43)公開日 平成7年(1995)3月14日

(51)Int.Cl.<sup>o</sup>  
C 1 2 P 7/60  
// (C 1 2 P 7/60  
C 1 2 R 1:38)  
(C 1 2 P 7/60  
C 1 2 R 1:15)

識別記号 庁内整理番号  
8114-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数11 OL (全10頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平6-154491  
(22)出願日 平成6年(1994)7月6日  
(31)優先権主張番号 特願平5-170247  
(32)優先日 平5(1993)7月9日  
(33)優先権主張国 日本 (JP)

(71)出願人 000002934  
武田薬品工業株式会社  
大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号  
(72)発明者 岡 正秀  
兵庫県川西市清和台西4丁目4番地の141  
(72)発明者 米戸 賢吉  
兵庫県神戸市東灘区御影中町3丁目2  
2-707号  
(72)発明者 山口 高正  
兵庫県神戸市垂水区塩屋北町2丁目10番3  
号  
(74)代理人 弁理士 青山 葵 (外1名)

(54)【発明の名称】 2-ケト-L-グロン酸の製造方法

(57)【要約】

【目的】 従来の2-ケト-L-グロン酸の微生物的製造における発酵時間の短縮、回収効率の向上。

【構成】 2-ケト-L-グロン酸(以下、2KGAと称することもある)生産能力を有する微生物を少なくとも1種用いた発酵法または菌体反応法による2KGAの製造方法において、発酵液または菌体反応液中に蓄積する生産物である2KGAを単独または対イオンとしての低分子陽イオンと共に電気透析により発酵液または菌体反応液から抜き取ることを特徴とする2KGAの製造方法。

【効果】 同一基質量で従来法にくらべ、発酵時間を著しく短縮でき、また、基質の高い酸化速度を長時間維持できる結果、1回の培養で得られる2KGA量を著しく増加できる。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 2-ケト-レーグロン酸(以下、2KGAと称することもある)生産能力を有する微生物を少なくとも1種用いた発酵法または菌体反応法による2KGAの製造方法において、発酵液または菌体反応液中に蓄積する生産物である2KGAを単独または対イオンとしての低分子陽イオンと共に電気透析により発酵液または菌体反応液から抜き取ることを特徴とする2KGAの製造方法。

【請求項2】 2KGA生産能力を有する微生物がシードグルコノバクター属、グルコノバクター属、シードモナス属、コリネバクテリウム属、エルウィニア属細菌またはこれらの組み合わせである請求項1記載の方法。

【請求項3】 2KGA生産能力を有する微生物がシードグルコノバクター属またはグルコノバクター属細菌である請求項1記載の方法。

【請求項4】 2KGA生産能力を有する微生物がシードグルコノバクター属細菌である請求項1記載の方法。

【請求項5】 2KGA生産能力を有する微生物がシードグルコノバクター・サッカロケトゲネスK591s(FERM BP-1130)、シードグルコノバクター・サッカロケトゲネスTH14-86(FERM BP-1128)、シードグルコノバクター・サッカロケトゲネス12-5(FERM BP-1129)、シードグルコノバクター・サッカロケトゲネス12-15(FERM BP-1132)、シードグルコノバクター・サッカロケトゲネス12-4(FERM BP-1131)およびシードグルコノバクター・サッカロケトゲネス22-3(FERM BP-1133)から選ばれる請求項1記載の方法。

【請求項6】 対イオンとしての低分子陽イオンが1価または2価の陽イオンである請求項1記載の方法。

【請求項7】 対イオンとしての低分子陽イオンがLi<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>またはNH<sub>4</sub><sup>+</sup>である請求項1記載の方法。

【請求項8】 発酵液または菌体反応液中の2KGA濃度を80mg/ml以下に維持しながら電気透析を行う請求項1記載の方法。

【請求項9】 2KGA生産能力を有する微生物を少なくとも1種用いた発酵法または菌体反応法による2KGAの製造を他の細菌の存在下で行う請求項1記載の方法。

【請求項10】 2KGA生産能力を有する微生物を少なくとも1種用いた発酵法または菌体反応法による2KGAの製造を、バチルス属、シードモナス属、プロテウス属、シトロバクター属、エンテロバクター属、エルウィニア属、キサントモナス属またはフラボバクテリウム属に属する細菌の共存下で行う請求項1記載の方法。

2

【請求項11】 2KGA生産能力を有する微生物を少なくとも1種用いた発酵法または菌体反応法による2KGAの製造を、バチルス・セレウス IFO3131、バチルス・リケニホルミス IFO 12201、バチルス・メガテリウム IFO 12108、バチルス・アミロリケファシエンス IFO 3022、バチルス・スブチリス IFO 13719、バチルス・サーキュランス IFO 3967、シードモナス・トリホリ IFO

10 12056、シードモナス・マルツフィリア IFO 12692、プロテウス・インコンスタンス IFO 12930、シトロバクター・フロインディ IFO 13544、エンテロバクター・クロアカ IFO 3320、エルウィニア・ハービコラ IFO 12686、キサントモナス・ビシ IFO 13556、キサントモナス・シリ IFO 3835、フラボバクテリウム・メニンゴセプティカム IFO 12535、ミクロコッカス・バリアンス IFO 3765またはエシェリヒア・コリ IFO 3366の共存下で行う請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、微生物を用いたL-アスコルビン酸合成の中間体として有用な2-ケト-レーグロン酸(以下、2KGAと称することもある)の製造方法に関する。さらに詳しくは、2KGAを最終生産物とする発酵または菌体反応を行うに際し、電気透析により培養液もしくは菌体反応液から、2KGA単独または2KGAを対イオンとしての低分子陽イオンと共に分離する、いわゆる電気透析発酵に関する。なお、以下、「2KGAを最終生産物とする発酵または菌体反応」を「2KGA発酵」と称することもあり、「菌体反応」も含めて「発酵」と称することもあり、また、「菌体反応液」も含めて「培養液」と称することもある。

## 【0002】

【従来の技術】L-アスコルビン酸合成の中間体として有用な2-ケト-レーグロン酸は、工業的に確立されたいわゆるライヒシュタイン法(Helvetica Chemica Acta第17巻、311頁、1934参照)によって生産されてきた。しかし、この方法は工程数が多く、多量の有機溶媒を必要とし、現代の工業技術としては満足すべきものではない。一方、ライヒシュタイン法に替わるものとして、主に微生物を用いた方法がいくつか提案されてきている。例えば、D-グルコースを微生物的に酸化して2,5-ジケト-D-グルコン酸にした後、これをさらに微生物的または化学的に2KGAへと還元する方法(特公昭39-14493号、特公昭53-25033、特公昭56-15877号、特公昭59-3592号参照)、さらに、コリネバクテリウムの2,5-ジケト-D-グルコン酸還元酵素遺伝子を2,5-ジケト-D

ークルコン酸生産能を有するエルビニアに組換えDNA技術により導入し、一段の発酵プロセスでD-グルコースから2KGAを得る方法、(サイエンス(Science)、第230巻、144頁(1985))、D-ソルビトールまたはL-ソルボースを出発物質とし、これをグルコノバクター属細菌を用いて酸化することによって2KGAを得る方法(特開平2-150287号参照)が報告されている。

【0003】また、土壤よりL-ソルボースを効率よく2KGAへと変換する能力を有する細菌シードグルコノバクター・サッカロケトゲネスが分離され(特開昭62-228288号参照)、さらに、特開昭64-85088号には、培地に希土類元素を添加することにより本菌の2KGA生成が著しく促進されるという知見に基づき上記菌を用いた効率の良いL-ソルボースからの2KGA生産プロセスが開示されている。

#### 【0004】

【発明が解決しようとする課題】これらの従来の方法では、いずれも用いる培養方法は、糖、糖アルコール、糖酸等の基質を培養開始時に一括添加するか、その一部または全部を半連続的もしくは連続的に添加して培養し、生成物である2KGAが充分量蓄積し、それ以上培養を続けても効率よく2KGAへの変換が起こらなくなつた時点で培養を止めて培養液を得る、バッチ培養あるいはフィード培養と呼ばれる培養法を採用している。しかし、これらの方法は、変換反応に要する時間、最終反応液中の生産物濃度の点で、必ずしも満足できるものではない。その原因としては種々考えられるが、例えば、生成する生産物、あるいは中和剤として添加するアルカリ塩もしくはこれらの複合効果による阻害等が挙げられる。

【0005】一方、乳酸発酵、酢酸発酵等の有機酸発酵では、生成する有機酸または中和剤として加えるアルカリ塩あるいはこれらの複合効果による阻害を回避するための試みとして、陽極と陰極の間に陽イオン交換膜と陰イオン交換膜を、必要により、バイポーラー膜を配置してなる電気透析槽に培養液を通して通電することによって、培養液中より生成物である有機酸、またはこれらの有機酸と共に対イオンとしての低分子の陽イオンを分離し、実質的に培養液中のこれらの濃度を低いレベルに維持する、いわゆる電気透析発酵を適用することが試みられている(特公昭56-50958号、特開昭62-146595号、日本発酵工学会1991年度大会講演要旨集参照)。また、電気透析槽中で、発酵により得られた生成物を電気透析によって発酵液から分離する通電透析発酵法において、ポリリン酸またはその塩を存在させることを特徴とする通電透析発酵法が特開昭63-148979号に記載されている。しかし、2KGAを最終生産物とする発酵においては、現在までにこの技術が適用されたことはなかった。

#### 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、これらの事情に鑑み、2KGA発酵におけるより有利な培養法を見出すべく、2KGA発酵にこの電気透析発酵を適用することを試み、銳意検討を重ねた。その結果、本発酵において電気透析によって培養液中より2KGAを分離することで、上記の、通常のバッチ培養またはフィード培養に比べ、同一量の基質を酸化する場合では発酵時間の著しい短縮を可能とし、さらには、培養時間を延長し、さらに基質をフィードすることにより、1回の培養で得られる2KGAを飛躍的に向上させることを可能とならしめ、本発明を完成するに至った。

【0007】すなわち、本発明は、(1)2-ケト-L-グロン酸(以下、2KGAと称することもある)生産能力を有する微生物を少なくとも1種用いた発酵法または菌体反応法による2KGAの製造方法において、発酵液または菌体反応液中に蓄積する生産物である2KGAを単独または対イオンとしての低分子陽イオンと共に電気透析により発酵液または菌体反応液から抜き取ることを特徴とする2KGAの製造方法、(2)2KGA生産能力を有する微生物がシードグルコノバクター属、グルコノバクター属、シードモナス属、コリネバクテリウム属、エルヴィニア属細菌またはこれらの組み合わせである上記(1)記載の方法、(3)2KGA生産能力を有する微生物がシードグルコノバクター属またはグルコノバクター属細菌である上記(1)記載の方法、(4)2KGA生産能力を有する微生物がシードグルコノバクター属細菌である上記(1)記載の方法、(5)2KGA生産能力を有する微生物がシードグルコノバクター・サッカロケトゲネスK591s(FERM BP-1130)、シードグルコノバクター・サッカロケトゲネスTH14-86(FERM BP-1128)、シードグルコノバクター・サッカロケトゲネス12-5(FERM BP-1129)、シードグルコノバクター・サッカロケトゲネス12-15(FERM BP-1132)、シードグルコノバクター・サッカロケトゲネス12-4(FERM BP-1131)およびシードグルコノバクター・サッカロケトゲネス22-3(FERM BP-1133)から選ばれる上記(1)記載の方法、(6)対イオンとしての低分子陽イオンが1価または2価の陽イオンである上記(1)記載の方法、(7)対イオンとしての低分子陽イオンがLi<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>またはNH<sub>4</sub><sup>+</sup>である上記(1)記載の方法、(8)発酵液または菌体反応液中の2KGA濃度を80mg/ml以下に維持しながら電気透析を行う上記(1)記載の方法、(9)2KGA生産能力を有する微生物を少なくとも1種用いた発酵法または菌体反応法による2KGAの製造を他の細菌の存在下で行う上記(1)記載の方法、(10)2KGA生産能力を有する微生物を少なくとも1種用いた発酵法ま

たは菌体反応法による2KGAの製造を、バチルス属、シュードモナス属、プロテウス属、シトロバクター属、エンテロバクター属、エルウィニア属、キサントモナス属またはフラボバクテリウム属に属する細菌の共存下で行う上記(1)記載の方法、(11)2KGA生産能力を有する微生物を少なくとも1種用いた発酵法または菌体反応法による2KGAの製造を、バチルス・セレウス

IFO 3131、バチルス・リケニホルミス IFO 12201、バチルス・メガテリウム IFO 12108、バチルス・アミルス IFO 12090、バチルス・アミロリケファシエンス IFO 3022、バチルス・スブチリス IFO 13719、バチルス・サーキュランス IFO 3967、シュードモナス・トリホリ IFO 12056、シュードモナス・マルトフィリア IFO 12692、プロテウス・インコンスタンス IFO 12930、シトロバクター・フロインディ IFO 13544、エンテロバクター・クロアカ IFO 3320、エルウィニア・ハービコラ IFO 12686、キサントモナス・ビシ IFO 13556、キサントモナス・シリ IFO 3835、フラボバクテリウム・メニンゴセプティカム IFO 12535、ミクロコッカス・バリアンス IFO 3765またはエシェリヒア・コリ IFO 3366の共存下で行う上記(1)記載の方法に関する。

【0008】本発明において用いられる2KGA生産能を有する微生物としては、例えば、公知のシュードグルコノバクター属細菌、グルコノバクター属細菌、シュードモナス属菌、コリネバクテリウム属細菌、2,5-ジケト-D-グルコン酸還元酵素遺伝子を組み込んだエルウィニア属細菌等が挙げられる。もちろん、これらの微生物に限らず、2KGAを生産する能力を有する微生物であれば、どのような微生物でも本発明の方法に用いることができる。特に、シュードグルコノバクター属細菌が好ましく用いられる。シュードグルコノバクター属の菌としては、例えば、特開昭62-228288号に記載のシュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスキ591s (FERM BP-1130)、12-5 (FERM BP-1129)、TH14-86 (FERM BP-1128)、12-15 (FERM BP-1132)、12-4 (FERM BP-1131)、22-3 (FERM BP-1133) 等の菌株が挙げられる。

【0009】また、培地組成、培養温度などの培養条件は、用いる菌株に適するように調整すればよく、例えば、シュードグルコノバクター属細菌を用いる2KGA発酵では、バチラス属細菌等と混合培養することによって、発酵促進効果が得られることが判明しており(特開昭62-228288号)、本発明においてもこれらの細菌を用いた混合培養を行うこともできる。

【0010】例えば、本発明においてシュードグルコノ

バクター属細菌をレーソルボースを含有する液体培地に培養し、2-ケト-レーグロン酸を培養液中に生成させる場合に、シュードグルコノバクター属細菌(以下、酸化菌または酸化菌株と称することがある)を単独で培養するよりも、本酸化菌とは別種の細菌を混在させると、2-ケト-レーグロン酸の生産量が顕著に増加する。混在させる菌としては、例えば、バチルス属、シュードモナス属、プロテウス属、シトロバクター属、エンテロバクター属、エルウィニア属、キサントモナス属およびフラボバクテリウム属等に属する菌が挙げられ、さらに具体例として下記に示す菌が挙げられる。

- 【0011】バチルス・セレウス(*Bacillus cereus*)  
IFO 3131
- バチルス・リケニホルミス(*Bacillus licheniformis*)  
IFO 12201
- バチルス・メガテリウム(*Bacillus megaterium*) IFO 12108
- バチルス・アミルス(*Bacillus pumilus*) IFO 12090
- バチルス・アミロリケファシエンス(*Bacillus amyloli quefaciens*) IFO 3022
- バチルス・スブチリス(*Bacillus subtilis*) IFO 13719
- バチルス・サーキュランス(*Bacillus circulans*) IFO 3967
- シュードモナス・トリホリ(*Pseudomonas trifolii*)  
IFO 12056
- シュードモナス・マルトフィリア(*Pseudomonas maltophilia*) IFO 12692
- プロテウス・インコンスタンス(*Proteus inconstans*)  
IFO 12930
- シトロバクター・フロインディ(*Citrobacter freundii*) IFO 13544
- エンテロバクター・クロアカ(*Enterobacter cloacae*)  
IFO 3320
- エルウィニア・ハービコラ(*Erwinia herbicola*) IFO 12686
- キサントモナス・ビシ(*Xanthomonas pisi*) IFO 13556
- キサントモナス・シリ(*Xanthomonas citri*) IFO 3835
- フラボバクテリウム・メニンゴセプティカム(*Flavobacterium meningosepticum*) IFO 12535
- ミクロコッカス・バリアンス(*Micrococcus varians*)  
IFO 3765
- エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*) IFO 3366
- 【0012】これらの菌のいずれかを適当な培地に、20℃~40℃で1日から4日間培養して得られる培養液  
50 を混合菌の種培養液として、用いることができる。その

移植量は通常、酸化菌（シュードグルコノバクター属）のそれの1/10から1/1000とするのが望ましい。この程度の移植量で混合菌を酸化菌と混合培養すると、酸化菌の生育が促進され、それにつれて、酸化菌単独培養の場合より、より高濃度のL-ソルボースが、より短い時間で2-ケト-L-グロン酸に酸化される。混合菌として用いられる細菌は、本発明の原料であるL-ソルボースや生産物である2-ケト-L-グロン酸の資化性が無いかまたは微弱な菌であることが望ましい。その他の培養条件は、酸化菌の単独培養と特に変わることろはない。前記の微生物の培養に用いられる培地は、該菌株が利用し得る栄養源を含むものなら液状でも固体状でもよいが、大量のものを得る時には液体培地を用いるのが好ましい。

【0013】該培地には、通常微生物の培養に用いられる炭素源、窒素源、無機塩類、有機酸塩および微量栄養素が用いられる。炭素源としては原料であるL-ソルボースがそのまま使用されうるが、その他の補助炭素源として、例えば、グルコース、グリセリン、ショ糖、乳糖、麦芽糖、糖蜜等が使用できる。窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類（例、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等）、コーン・スティーブ・リカ（以下、CSLと称することもある）、ペアトン、肉エキス、酵母エキス、乾燥酵母、大豆粉、綿実粕、尿素等の無機または有機の窒素含有物が挙げられる。また無機塩類としては、カリウム、ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、鉄、マンガン、コバルト、亜鉛、銅およびリン酸の塩類が用いられる。微量栄養素としては前記の菌の生育必須因子であるCoA、パントテン酸、ビオチン、チアミン、リボフラビンは勿論のこと、生育および2-ケト-L-グロン酸生成に促進的効果を示すフラビンモノヌクレオチド（以下FMNと称することもある）、フラビニアデニジヌクレオチド（以下FADと称することもある）、その他のビタミン類、L-システイン、L-グルタミン酸、チオ硫酸ナトリウム等が化合物として、または、それらを含むものとして天然物を適宜加えられる。

【0014】培養の手段は、静置培養でも、振盪培養あるいは通気攪拌培養法等の手段を用いてもよい。大量の処理には、いわゆる深部通気攪拌培養によるのが望ましい。培養条件は、勿論菌株の種類、培地の組成、その他によっても異なり、要するに目的物が最も効率よく生産されるように個々の場合に応じて選択すればよい。例えば、培養温度は25~35℃にて行うのがよく、培地のpHは5~9程度が望ましい。目的物の生成に伴ってpHが低下するのが一般的であるので、適当な塩基性物質、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニアを添加して常に微生物の2-ケト-L-グロン酸生成に最も適したpHを保持するのもよく、また培地中に適当な緩衝剤を添加しておいて最適のpHが維持されるよう

にするのもよい。

【0015】この他、前記の酸化菌とは別種の細菌の滅菌培養物を培地成分として有効に利用することもできる。利用できる菌としては、例えば、バチルス菌、シュードモナス菌、シトロバクター菌、エシェリヒア菌およびエルウェイニア菌に属する菌が挙げられ、さらに具体例として下記に示す菌が挙げられる。

バチルス・セレウス(*Bacillus cereus*) IFO 31  
31  
10 バチルス・スブチリス(*Bacillus subtilis*) IFO 3023  
バチルス・プミルス(*Bacillus pumilus*) IFO 12089  
バチルス・メガテリウム(*Bacillus megaterium*) IF O 12108  
バチルス・アミロリケファシエンス(*Bacillus amyloli quefaciens*) IFO 3022  
シュードモナス・トリホリ(*Pseudomonas trifolii*) IFO 12056  
20 シトロバクター・フロインディ(*Citrobacter freundii*) IFO 12681  
エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*) IFO 3456  
エルウェイニア・ハービコラ(*Erwinia herbicola*) IF O 12686  
これらの細菌を、これらが生育しうる培地に、20℃~40℃で2日間から4日間培養し、得られる培養液を滅菌し、これを本酸化菌の培地に0.5~5.0%(v/v)の割合で加え、酸化菌の生育を促進させることもできる。  
30 【0016】本発明においては、2KGA生産のための培養条件としては、通常の発酵（主発酵培地に少量の種培養液を移植し、菌体の増殖を伴って2KGA生産が起こる）方法を用いてもよい。また、予め、別の培養で2KGA生成能力を有する菌体を得ておき、これを用いて実質的に増殖をほとんど伴わない菌体反応法、または両者を組み合わせた方法を用いてもよい。上記通常の発酵方法を用いる場合は、十分に菌が増殖した時点で電気透析を開始するのが望ましいが、菌体反応法または、場合により発酵方法を用いる場合でも、最初から電気透析を行い、実質的に培養時間の短縮を図ることもできる。  
40 【0017】本発明の方法は、2KGA発酵において、例えば、培養槽ないしは反応槽からの培養液を、所望により、沪過、遠心分離等で菌体を除去した後、イオン交換膜と、要すればバイポーラー膜を備えた電気透析槽に導き、通電して電気透析を行い、2KGAを単独で、または対イオンとしての培養液中の低分子陽イオン、例えば、Li<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>等の1価または2価の低分子陽イオンと共に培養液から分離、濃縮し、ついで常法により2KGAを回収することにより50 行うことができる。

【0018】本発明で用いる電気透析槽の一例としては、例えば、図2に示すような陽極1と陰極2との間にカチオン交換膜Cおよびアニオン交換膜Aを交互に配置した装置が挙げられ、通常、一対以上のイオン交換膜を使用するのがよい。本発明の電気透析に用いるイオン交換膜は、アニオン交換膜、カチオン交換膜のいずれも公知のものが使用でき、とりわけ市販品でもよく、例えば、ネオセアタ(徳山製)、セレミオン(旭硝子製)等の市販品から選択して用いることができる。アニオン交換膜は、目的生産物である2KGAを透過する大きさまたはそれ以上の大きさのポアを持つ膜で、2KGAを実質的に十分効率よく透過するものでよいが、さらには、できるだけ基質の洩れが少なく、かつ電気抵抗のなるべく小さいものを選ぶのが望ましい。

【0019】電極液としては、目的に応じて $H_2SO_4$ 、 $HNO_3$ 、 $NaOH$ 、 $KOH$ 等の酸、アルカリ等、または $Na_2SO_4$ 、 $K_2SO_4$ 、 $NaNO_3$ 、 $KNO_3$ 等のアルカリ金属塩を使用することができる。図2で示される装置を用いる電気透析には、通常、アルカリ金属塩の溶液を使用する。発酵液あるいはその沪過液に $Ca^{2+}$ 、 $Ba^{2+}$ 等が存在する場合は、 $NaNO_3$ 溶液または $KNO_3$ 溶液を用いるのが望ましい。用いる電気透析槽も、培養中のpH低下を防ぐために添加する水酸化ナトリウム、アンモニア等のアルカリの使用量を低減するため、培養液または反応液から2KGAをフリーの形で分離し、対イオンとしての低分子陽イオンは培養槽もしくは反応槽に戻せる構造のものでもよい。工業的には、装置がコンパクトにでき、構造がシンプルで透析効率が優れている等の特徴から、添加したアルカリ性陽イオンとともに分離する構造を持つものが望ましく、例えば、市販品ではマイクロアシライザー(旭化成製)等を用いることができる。

【0020】かかる電気透析を行う際に、培養液あるいは菌体反応液を直接電気透析槽に導入してもよいが、電気透析膜の性能の低下を防ぐためには、途中に沪過もしくは遠心分離等の菌体分離工程を加え、菌体は培養槽へ再循環させ、一方で、清澄液について電気透析を行う方法が望ましい。菌体分離を沪過で行うには、通常、クロスフロー型沪過器、例えば中空糸膜沪過器あるいはセラミック膜沪過器が用いられる。これらは沪過効率を上げるために高循環流速を与えることが望ましい。循環流速を小さくして沪過効率を上げるために、ボルテックスフロー沪過装置、例えば市販のベンチマーク(Benchmark)あるいはペースセッター(Pacesetter)(メンブレックス・インコーポレーティッド、米国)が好ましく用いられる。添付の図1に、この方法に用いる装置の1例の概略図を示す。

【0021】この装置を用いて本発明の方法を実施するには、培養槽からの培養液をポンプ1により、菌体分離装置、通常、沪過装置を通して沪過する。菌体は培養槽へ再循環する。沪液をリザーバーに保持し、ついでポン

プ2を介して電気透析槽に導き、電気透析に付す。電気透析槽からの濃縮液はポンプ3を介して濃縮液槽と電気透析槽の間を循環させ、後の回収工程に送るのが好ましい。電気透析槽を通過した培養沪液はリザーバーに戻され、リザーバー中の沪液および電気透析槽よりの返送液はポンプ4を介して培養槽へ再循環できる。

【0022】電気透析による培養液中の2KGA濃度の制御は、用いる菌株の2KGA生成を著しく阻害しない範囲に断続的あるいは連続的にコントロールすればよ  
10く、例えば、シュードグルコノバクター属細菌を用いる場合、8.0mg/ml以下、望ましくは5.0mg/ml以下になるように電気透析を行う。基質は一括添加してもよいが、連続的に添加し、培養液中の残存基質濃度をたえず低く保持するのが有利である。例えば、シュードグルコノバクター属細菌を用いる場合、2KGA生成効率も考慮すると基質濃度は5～5.0mg/ml、望ましくは1.0～3.0mg/mlに保持するのがよい。上記のごとく、基質は一括添加してもよいが、2KGA生成を阻害しないよう  
20に、その一部あるいは全量を分割あるいは連続的に添加することが望ましく、また、培養中に2KGA生成を持続あるいは促進させる物質、例えば、酵母エキス、コーン・スティーブ・リカーやの有機性栄養物、ビタミン類、アミノ酸類、核酸類の微量栄養素あるいは無機塩等を添加することもできる。基質としては糖、糖アルコール、糖酸等が用いられるが、とりわけL-ソルボース、D-ソルビトール、L-ソルボソン等に前記の菌を作用させるのが効率的である。

【0023】なお、培地および培養手段を含め、培養条件は使用する細菌および基質に応じて適宜決められる。  
30 例えば、シュードグルコノバクター属の細菌を用いる培養の場合は、前記特開昭62-228288号に記載の培地や培養条件を採用することができる。また、シュードモナス属の細菌を用いる培養の場合は、例えば特開昭63-112989号に記載の条件またはそれに準じる条件で培養することができる。

【0024】培養液に加えた基質が十分に2KGAに変換されたところで電気透析を止め、培養液、濃縮液の両方から2KGAを回収してもよいが、好ましくは、さらに電気透析を続けることにより培養液中の2KGAを全て濃縮液中に移動させ、ここから回収するほうが、2KGA精製を行うに際してより有利である。培養液あるいは濃縮液から2KGAを回収する方法としては通常用いられる方法、例えば、イオン交換樹脂カラム等のカラムクロマト類、濃縮あるいは溶媒添加による晶出・再結晶等が適用できる。

【0025】  
【実施例】以下、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、これらの実施例は本発明を限定するものではない。なお、2KGAの定量は、下記に示す条件下  
50 で高速液体クロマトグラフィー法によって行った。

11

高速液体クロマトグラフィー測定条件:  
カラム: SCR101H、300×7mm(島津製作所  
製)、カラム温度30°C

移動相: 4 mM硫酸

検出器: R I 検出器

## 【0026】実施例1

## 1) 対照実験(標準培養)

表2に示す組成の種培地A 20mlを200ml容三角フラスコに入れ、120°Cにて20分間滅菌した。これに、表1に示す組成の斜面培地で30°Cにて3日間生育させたシュードグルコノバクター・サッカロケテゲネスK591s株(IF014464、FERM BP-11130; 以下、単に酸化菌と称することもある)の菌体を一白金耳植菌し、28°Cで1日間振とう培養することによって第1種培養液を得た。同様に、種培地A 200mlを1リットル容の三角フラスコに入れ、滅菌したものを2本用意し、これに第1種培養液を10mlずつ植菌し28°Cにて2日間振とう培養して第2種培養液を得た。表3に示す組成の種培地B 20mlを200ml容三角フラスコに入れ滅菌したものに、表2に示す組成の斜面培地で生育させたバチラス・メガテリウム(IF012108)の菌体を一白金耳植菌して28°Cにて2日間振とう培養してバチラス・メガテリウム(以下、単に混合菌と称することもある)の種培養液を得た。

【0027】L-ソルボース50g、CSL60g、FeSO<sub>4</sub>3g、硫安9g、ビタミンB<sub>2</sub>3mg、ショ糖1.5gを水道水で1660mlにして、NaOHでpHを7に調整した後、滅菌して主発酵培地を得た。ここに酸化菌の第2種培養液300mlと混合菌の種培養液4mlを加え、さらに0.3gの粗塩化ヒ素(三菱化成工業(株))を10mlの水に溶かして滅菌したものを加え、滅菌したら5リットル・ジャーファーメンターに入れ、温度32°C、攪拌800rpm、通気0.5vvmの条件で培養を開始した。pHセンサーと連動したペリスタルティックポンプを用いて、30%NaOHを自動的に添加することによってpHを6.2に維持した。一方、400gのL-ソルボースを水道水に溶かして900mlにしたものを滅菌し、培養液中のソルボース濃度が10~30mg/ml前後になるようにこれを連続的に添加した。その結果、合計450gのソルボースを40時間で全て酸化し、354gの2KGA(フリーアンドリードとして;以下も同様)が培養液中に蓄積した。

## 【0028】2) 電気透析培養

別に用意した滅菌した5リットル・ジャーファーメンターを培養槽として用い、これに図1に示すように中空糸膜(マイクローザPMP102、旭化成製)および電気透析槽(マイクロアシライザーG3、旭化成製)を組み付け、透析膜としてはAC-120-800(同じく旭化成製)を装着し、上記と同じく主発酵培地、酸化菌種培養液、混合菌種培養液、および粗塩化ヒ素滅菌水溶液を滅菌ジャーファーメンターに入れ、同条件で培養を開始

12

した。上記の方法でpHコントロールしながら、400gのL-ソルボースを水道水に溶かし、900mlにしたものを滅菌し、同様に連続的に添加した。培養開始より9時間までは通常の培養(ポンプ停止)を行い、9時間目よりポンプで培養液を中空糸膜済過器とジャーファーメンター間を3リットル/分の流速で循環させ、流出していく沪液をリザーバー(0.5リットル容)を介して電気透析機に循環させ(流速1リットル/分)、0.5リットルを超えるものについては再びジャーファーメンターに還流させた。ジャーファーメンター以外の用いたすべての装置および連結チューブは、前もって、0.5%水酸化ナトリウムおよび0.5%次亜塩素酸ナトリウムで滅菌し、滅菌水で洗浄した。電気透析を開始し、培養液中の2KGA濃度が50mg/mlを超えないように電気透析機を運転した。その結果、合計450gのL-ソルボースを22時間で全て酸化し、さらに2時間電気透析することによって、培養液中に生成した2KGAは実質上ほとんどすべて濃縮液(最終液量1.8リットル)中に回収され、360gの2KGAが得られた。

10 20

## 【0029】

## 【表1】

| 斜面培地(g/1)         |    |
|-------------------|----|
| ソルビトール            | 25 |
| ペプトン              | 10 |
| 酵母エキス             | 10 |
| CaCO <sub>3</sub> | 2  |
| 寒天                | 20 |

30 40

## 【0030】

## 【表2】

| 種培地A(g/1) |    |
|-----------|----|
| ラクトース     | 10 |
| イーストエキス   | 10 |
| CSL       | 30 |
| 硫安        | 3  |
| pH 7.0    |    |

## 【0031】

## 【表3】

13

| 種培地B(g/1)                            |      |
|--------------------------------------|------|
| シロ糖                                  | 4.0  |
| プロプロ                                 | 4.0  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 6.5  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 5.5  |
| NaCl                                 | 0.5  |
| 硫酸                                   | 0.5  |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0.05 |
| パンテン酸カルシウム                           | 0.25 |
| pH 7.0                               |      |

## 【0032】実施例2

## 1) 標準培養

実施例1の1)と同様に標準培養を行った。培養40時間で全てのソルボースが酸化し、356gの2KGAが培養液中に蓄積した。

## 2) 電気透析培養

電気透析培養は、L-ソルボースのフィード条件以外については実施例1の2)と同じ条件で行った。フィードは1150gのL-ソルボースを水道水に溶かして2700mlにしたもの滅菌し、実施例1と同様に連続的に添加した。その結果、培養36時間ですべてのL-ソルボースが酸化され、この時点でジャーファーメンターの通気・攪拌を停止した上で、さらに2時間電気透析を続けることによって、培養液中および中空糸膜沪過液中の2KGAは実質上ほとんどすべて濃縮液中に回収され、960gの2KGAが濃縮液(最終液量4.5リットル)中に得られた。

## 【0033】実施例3

## 1) 電気透析-純粹培養

実施例1の2)と同じく電気透析培養装置を準備した。ただし、実施例1の2)とは異なり、図1に示す菌体分離装置には中空糸膜沪過器(マイクローザPM102)の代わりにボルテックスフロー沪過装置(ベンチマークシステム;メンブレックス・インコーポレーティッド(Membrex, Inc.)、米国)にウルトラフィルタ(X-100ウルトラフィルター(メンブレックス・インコーポレーティッド、米国))を装着した。L-ソルボース50g、CSL60g、FeSO<sub>4</sub>3g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>9g、ビタミンB<sub>2</sub>3mg、シュークロース1.5g、イーストエキス30gを水道水で1660mlにして、NaOHでpHを7に調整した後、滅菌して主発酵培地を得た。これに、酸化菌種培養液、粗塩化ヒ素水溶液を入れ培養を開始し、フィード用にはL-ソルボースの50%W/V水溶液を用いた。培養中のpHは、実施例1と同じく30%NaOHで6.2に維持した。培養9時間目からポンプによってジャーファーメンターとボルテックスフロー沪過装置の間で培養液を循環させて(循環流速0.25リットル/分)菌体沪過を行い、得られた沪過液について実

10

## 【表4】

| 培養時間<br>(時間) | ソルボース酸化速度<br>(g/時間) |  |
|--------------|---------------------|--|
| 0            | 0.0                 |  |
| 5            | 6.0                 |  |
| 10           | 33.2                |  |
| 15           | 42.3                |  |
| 20           | 40.2                |  |
| 25           | 41.3                |  |
| 30           | 43.2                |  |
| 35           | 42.0                |  |
| 40           | 40.2                |  |
| 45           | 40.3                |  |
| 50           | 38.2                |  |
| 55           | 24.0                |  |
| 60           | 10.2                |  |

## 【0035】2) 電気透析-混合培養

30 ボルテックスフロー沪過装置を組み込んだ電気透析培養装置にて、実施例3の1)と同様にして培養を行った。ただし、主発酵培地からはイーストエキスを除き、培養開始時に実施例1と同様に調製した混合菌種培養液4mlを加えた。上記と同じく9時間目から電気透析培養を行い、150時間目に培養、菌体沪過、電気透析を停止させた。表5に酸化速度の推移を示した。その結果、5720gのL-ソルボースを酸化し、濃縮液中に4277g、培養液と菌体沪過液中に合わせて200g、合計4477gの2KGAが得られた。

## 40 【0036】

## 【表5】

50

15

| 培養時間<br>(時間) | ソルボース酸化速度<br>(g/時間) |
|--------------|---------------------|
| 0            | 0.0                 |
| 5            | 6.7                 |
| 10           | 37.2                |
| 20           | 39.2                |
| 30           | 42.1                |
| 40           | 41.3                |
| 50           | 40.2                |
| 60           | 41.1                |
| 70           | 42.2                |
| 80           | 41.2                |
| 90           | 41.3                |
| 100          | 40.7                |
| 110          | 41.5                |
| 120          | 42.2                |
| 130          | 41.1                |
| 140          | 40.8                |
| 150          | 40.9                |

16

【0037】上記結果から明らかなように、1)の純粋培養の場合、L-ソルボースの高酸化速度が維持できたのは培養開始後50時間までであったのに対し、2)の混合培養では培養開始後150時間経過しても高酸化速度が維持された。

## 【0038】

【発明の効果】本発明によれば、2KGA発酵において、電気透析発酵法を用いることにより、従来の発酵法または菌体反応法に比べ、同一量の基質を酸化する場合、培養時間を著しく短縮でき、また、基質の高い酸化速度を長時間維持できる結果、1回の培養で得られる2KGA量を著しく増加できる。

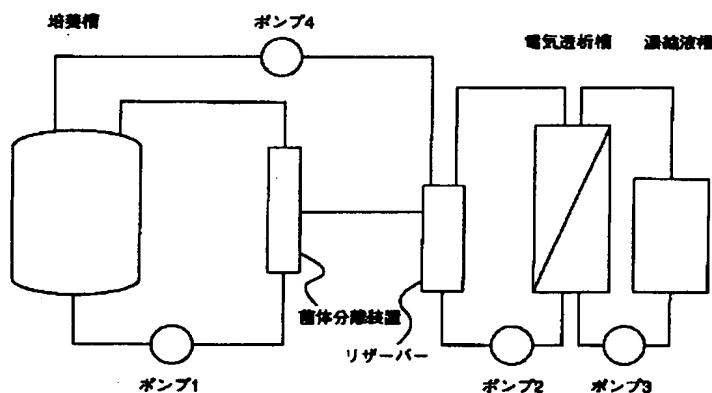
## 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の方法に用いる装置の1具体例の概略図である。

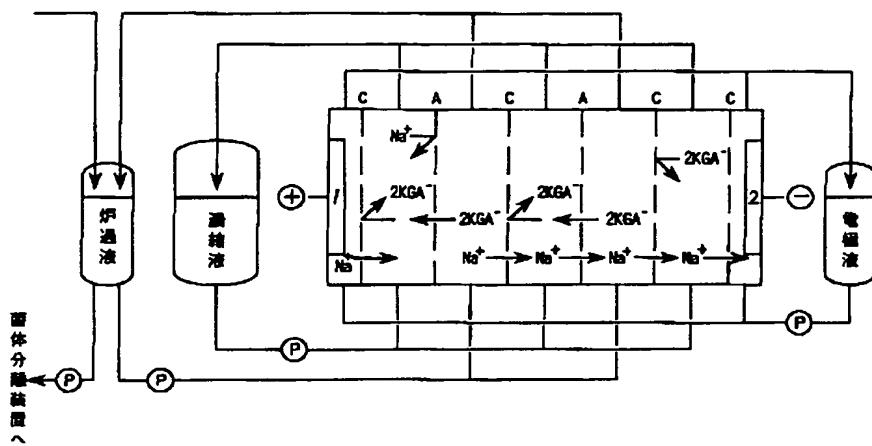
【図2】本発明に用いる電気透析槽の1具体例の概略図である。図中、Aはアニオンを通しカチオンは通さないアニオン交換膜、Cはカチオンを通しアニオンは通さないカチオン交換膜、Pはポンプを示す。

20

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int.C1.6

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(C 1 2 P 7/60

(C 1 2 R 1:18)

(C 1 2 P 7/60

(C 1 2 R 1:07)